

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①2 Offenlegungsschrift
①1 DE 3734588 A1

⑤1 Int. Cl. 4:
G 01 J 3/18
G 01 J 3/14
G 01 N 21/25
A 61 B 5/14

②1 Aktenzeichen: P 37 34 588.5
②2 Anmeldetag: 13. 10. 87
④3 Offenlegungstag: 27. 4. 89

DE 3734588 A1

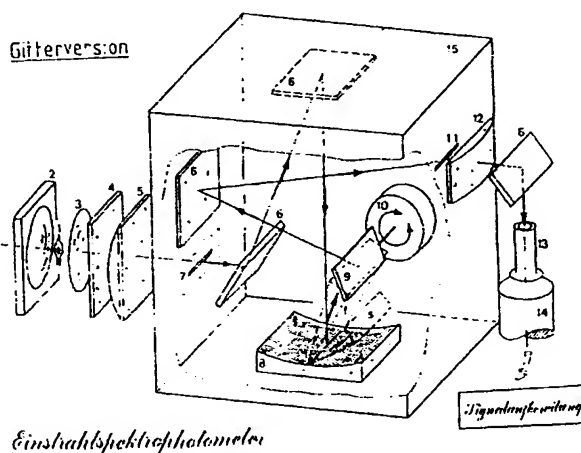
- ⑦1 Anmelder:
Schmidt, Werner, Dr.rer.nat.habil., 7750 Konstanz,
DE
- ⑦4 Vertreter:
Haft, U., Dipl.-Phys.; Czybulka, U., Dipl.-Phys., 8000
München; Berngruber, O., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.,
Pat.-Anwälte, 8232 Bayerisch Gmain

⑦2 Erfinder:
gleich Anmelder

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Registrierendes Photometer hoher Anpassungsfähigkeit

Die Erfindung betrifft ein Einstrahlspektrophotometer, dessen zentrale Komponente ein neuartiger Monochromator (15) ist, bei dem der von einer Beleuchtungsoptik (1-5) kommende Meßstrahl von einem feststehenden Streugitter (8) dispergiert wird, und das Streulicht erster Ordnung (f) mittels eines Computer-gesteuerten optischen Elements (10) bzgl. der Wellenlänge im Millisekundenbereich über den Ausgangsspalt (11) hinwegbewegt wird. Wahlweise läßt sich das Gitter durch ein feststehendes Prisma mit angegebenem Strahlengang ersetzen (Nebenbild Abb. 1). Charakteristisch ist der senkrechte Strahlengang durch die Küvette (13). Herkömmliche registrierende Photometer sind typischerweise Doppelstrahlgeräte, was einen langsamen Wellenlängenvorschub im Minutenbereich und die Vermessung nur klarer, nicht streuender Proben mit einer typischen optischen Dichte unterhalb $A = 2$ impliziert. Diesen einschneidenden Einschränkungen unterliegt das hier beschriebene Photometer nicht mehr. Eine besonders hohe Lichtstärke bei geringem Streulichtanteil wird durch gezielten Einsatz von Zylinderoptiken zur linienförmigen Fokussierung der Lichtquelle auf den Eingangsspalt (7) und zur punktförmigen Fokussierung des Ausgangsspalts (11) auf eine Spezialküvette (13) erreicht, sowie durch eine vergleichsweise kleine Zahl Licht-ablenkender Elemente (etwa 1/3 der üblichen Zahl). In Verbindung mit einem geringen Abstand zwischen Probe (13) und Detektor (14) zeichnet sich diese Anordnung ...



DE 3734588 A1

1 Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Einstrahlspektrophotometer (Abb. 1), bestehend aus einer Beleuchtungsoptik, einem Monochromator und einer Abbildungsoptik, die den kollimierten, monochromatischen Lichtstrahl auf eine Küvette lenkt, und einem Photodetektor mit anschließender elektronischer Meß- und Auswerteschaltung.

Die optische Spektrophotometrie ist heute eine universell einsetzbare Analyseverfahren in Naturwissenschaft und Technik. Doch lassen sich in der Regel mit dem herkömmlichen registrierenden Doppelstrahlspektrometer nur klare Proben, d. h. gelöste Stoffe messen. Die Vermessung trüber, stark streuender Proben ist weitgehend ausgeschlossen und nur mit Spektrophotometern der oberen Preisklasse, und dann auch nur mit Einschränkungen, möglich. Andererseits sind aber sehr viele, wenn nicht gar die meisten Proben per se trübe, und müssen zwecks spektraler Vermessung zuvor in Lösung gebracht werden, vorausgesetzt, es ist überhaupt möglich. Absorptionsmessungen in vivo oder sonstigen festen Körpern sind daher ausgeschlossen. Messungen bei Tieftemperatur (flüssige Luft!) sind mit konventionellen Zweistrahlenspektrophotometern schwierig, relativ ungenau, zeitraubend, und verlangen typischerweise einen Umbau des Spektrometers und aufwendige "Optionen". Weiterhin sind aus weiter unten erläuterten Gründen Doppelstrahl-Spektrophotometer vergleichsweise langsam (s. u.). Dieses ist zum einen inökonomisch bei der Vermessung einer großen Zahl von Proben, zum andern ist Geschwindigkeit eine notwendige Voraussetzung für die spektrale Vermessung von kurzlebigen Intermediären.

Oftmals fällt die Aufgabe an, eine Probe bzgl. verschiedener Wellenlängenpositionen präzise zu vermessen oder selektiv zu bestrahlen, etwa bei der hochaktuellen Bestimmung von Ca^{2+} , in vivo und in vitro, mittels der Fura II-Methode (Grzegorz Grynkiewicz, Martin Poenie and Roger Y. Tsien, 1985, J. of Biol. Chemistry 260, 3440—3450, A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties), bei der Bestimmung "photochromer Pigmente" wie etwa dem physiologisch bedeutenden Forschungsgebiet "Phytochrom", einem Pigmentsystem aller grünen Pflanzen, welches aus zwei interkonvertierbaren Formen (Pr, Pfr) besteht, oder allgemein in der Kolorimetrie, bei welcher gleichzeitig mehrere Komponenten, die oben drein einer zeitlichen Veränderung unterliegen, spektral bestimmt werden müssen. Eine schnelle "Multikomponentenanalyse" insbesondere an trüben Proben, wie sie etwa in der Zementfabrikation, der Galvanik (Autoindustrie), beim Härten oder (farbigem!) Eloxieren anfallen, ist mit dem hier beschriebenen Spektrometer möglich.

Herkömmliche Doppelstrahl-Spektrometer sind typischerweise "Tischgeräte"; sie sind mechanisch aufwendig, komplex, kostspielig und damit erfahrungsgemäß Serviceintensiv. Wünschenswert wäre eine robuste Konstruktion mit möglichst wenigen (beweglichen) hardware-Komponenten, die aber andererseits eine hohe Flexibilität gewährleistet, um auf die verschiedenen Erfordernisse angepaßt werden zu können: So bedürfen z. B. große Betriebe hochauflösender Spitzengeräte mit holographischen Gittern für Forschung und Reklamationsabwicklung, die durch Fachleute bedient werden, andererseits handlicher, preiswerter (mit geritztem Gitter) und sehr einfach zu bedienender Spektrometer für die laufende Betriebsüberwachung durch Hilfspersonal

und für den Einsatz "vor Ort".

Durchweg alle registrierenden (die Wellenlänge kontinuierlich durchstimmenden) Spektral-Photometer beruhen heute auf dem Zweistrahlprinzip: Der aus dem Monochromator kommende Lichtstrahl wird in zwei möglichst gleiche Einzelstrahlen aufgeteilt. Diese durchlaufen die Probe (S, Abb. 2, oben) bzw. die Referenz (R), werden wieder vereinigt, mit einem Sektorenrad ("chopper") phasenselektiv moduliert und auf den Lichtdetektor fokussiert. Abschließend wird mittels eines logarithmischen und eines lock-in Verstärkers die Optische Dichte $A = \log I_0/I$ berechnet. Durch Einführung eines Referenzstrahlenganges kann die Dispersion der verschiedenen optischen Komponenten, wie Lampe, Monochromator und Detektor, Linsen, Spiegel etc. auch ohne Computereinsatz weitgehend eliminiert werden; vor allem kurzfristige Schwankungen in den Spannungsversorgungen des Photomultipliers bzw. der Meßlampe wurden so kompensiert und das Signal-Rauschverhältnis (Signal to Noise Ratio) verbessert. Der Strahlengang durch die Küvetten ist durchweg waagrecht angeordnet, sie haben eine Dicke von 1 cm (aus historischen Gründen, $A = \epsilon \cdot d \cdot c$, ϵ = Extinktionskoeff., d = Dicke, c = Konzentration), und fassen 3 ml Probenvolumen, "Sparküvetten" etwa $1/2$ ml. Tieftemperatur-Spektren (flüssige Luft!) erfordern die etwas aufwendige Präparation zweier Spezial-Küvetten (Dewar!), wobei klare Gläser, die mit Hilfe besonderer Lösungsmittelgemische erzeugt werden, unabdingbar sind (ein Sprung in solchen Gläsern macht eine spektrale Vermessung nahezu unmöglich).

Die Zweistrahligkeit bringt zwei wesentliche Einschränkungen bzgl. des Anwendungsbereichs mit sich. Zum einen ist der Abstand zwischen Probe und Referenz zum Photodetektor — vornehmlich einem Photomultiplier — groß (Abb. 2, oben). Der erfaßte Raumwinkel beträgt etwa 0,002 Steradian. Dieses erfordert "optisch einwandfreie" Proben, die den Strahlengang also nicht signifikant stören, d. h. klare Lösungen. Zum anderen besagt ein Meßtheorem, daß die Meßgeschwindigkeit, mit der die Wellenlänge "durchgefahren" wird, in einer bestimmten Beziehung zur Umlauffrequenz des Sektorenrads stehen muß. Das führt bei konventionellen Spektrometern zu Scanzeiten im Minutenmaßstab (typisch: 1000 nm/min), will man einen "tracking error" (Wellenlängenverschiebung) vermeiden.

Das beschränkte Auflösungsvermögen herkömmlicher Doppelstrahl-Spektralphotometer ($\pm 0,001 \text{ \AA}$) rührt daher, daß die beiden Strahlen, welche die Probe bzw. die Referenz abtasten, im Widerspruch zur idealistischen Annahme eben nicht wirklich identisch sind (Abb. 2, oben), und vor allem leicht verschiedene (stets unterschiedlich empfindliche) Teilflächen auf dem Photodetektor, vornehmlich einer Photomultiplierkathode, treffen. Dieses führt zu Abweichungen von der idealen "baseline", ein Fehler, der bei Geräten der gehobenen Preisklasse mit Hilfe von heute üblicherweise dabei verwendeten on-line Mikro-Computern kompensiert werden kann.

Den gravierenden "Zeitnachteil" konventioneller Doppelstrahl-Spektrophotometer versucht man in jüngster Zeit mit "Diodenarray-Spektrometern" zu vermeiden. Hier greift man auf ein Gebrauchsmuster der Firma PAR aus dem Jahr 1969 zurück (Abb. 2, unten):

Das von einem Streugitter aufgefächerte Licht wird dabei nicht mehr sequentiell durch Drehung des Gitters an einem Ausgangsspalt vorbeigeführt. Vielmehr stellt man viele hundert winziger lichtempfindlicher Dioden

(256, 512 und seit neuestem 1024 Stück, je etwa 25 µm breit, 1 mm hoch, "Diodenarray") in den Fächer gestreuten Lichts erster Ordnung (feststehendes Gitter). Jede Diode entspricht einer Wellenlänge, womit sich das gesamte Spektrum (innerhalb einer Oktave bei Streulicht erster Ordnung! Abb. 9) gleichzeitig und schnell aufnehmen läßt, wenn man nur eine entsprechend "schnelle Lichtquelle" (Blitzlampe) verwendet. Dieser Vorteil steht einer Reihe von Nachteilen des Diodenarray-Spektrophotometers gegenüber:

— Die Wellenlängenauflösung von Diodenzeilen ist naturgemäß beschränkt.

— Der effektive Photodetektor, eine Einzeldiode, ist extrem klein (typisches Maß 25 µm × 1 mm), verglichen etwa mit einem "end-on" Photomultiplier mit typischer Photokathode von 1 Zoll Durchmesser. Darüber hinaus ist die Empfindlichkeit eines Halbleiterdetektors ohnehin geringer als die eines Photomultipliers. Nur die hohe Empfindlichkeit des Photomultipliers erlaubt das "single photon counting", was mit der Diodenzeilentechnik prinzipiell ausgeschlossen ist. Optische Dichten auch klarer Proben von mehr als $A = 0,7$ sind nicht mehr meßbar (herkömmliche Doppelstrahlspektrometer erlauben Messungen bis üblicherweise $A = 2$). Das liegt einmal in der Verwendung des Diodenarrays, zum andern am naturgemäß höheren Streulichtuntergrund eines solchen Systems.

— Durch die vorgegebene Größe des Diodenarrays (z. B. 25 mm breit) ist der nutzbare Wellenlängenbereich des Gitters festgelegt, und damit das Gitter selbst. Für verschiedene Bereiche werden verschiedene Gitter nebeneinander benutzt: etwa eines für 200–400 nm, ein anderes für 400–800 nm (eine Oktave maximal, vgl. Abb. 9). Das erforderliche "Ordnungsfilter" bringt man als Folie gewöhnlich unmittelbar vor den Diodenarray, womit der Wellenlängenbereich permanent fixiert ist. Die "natürliche" Lichtstärke eines Gitters (z. B. 30 mm hoch) wird nur zu einem Bruchteil genutzt (typische Diodenhöhe weniger als 1 mm).

— Diodenzeilen sind bislang nur in flacher Bauweise herzustellen, für die man sog. "flat grids" (Spezialgitter mit ebener Bildebene) benötigt. Diese sind — trotz hohen Preises — mit relativ großen "Linsenfehlern" behaftet, die man noch nicht voll im Griff hat. Hierdurch leidet vor allem die Wellenlängenauflösung, die ohnehin bei Diodenzeilen-Spektrometern vergleichsweise klein ist.

— Beim Diodenzeilen-Spektrophotometer wird die Probe kurzzeitig, aber eben deshalb notwendigerweise, mit sehr intensivem Weißlicht (gesamtes sichtbares Spektrum) bestrahlt (mindestens 50 W pro Nanometer Auflösung). Die hieraus resultierende Strahlenbelastung ist in vielen Anwendungsfällen, insbesondere in Biologie und Medizin, untragbar (Bleichreaktionen: Biologie, Biochemie). Wird eine hohe Zeitauflösung gewünscht (der einzig markante Vorteil eines Diodenarray-Spektrophotometers), so ist die Absorptionsauflösung schlechter als $A = 1$. Dieses beruht auf der schlechten Reproduzierbarkeit von Blitzen, sowohl was die Intensität, als auch den zeitlichen Verlauf betrifft. Mit kontinuierlichen Lichtquellen wird die Auflösung bis in den Bereich $\delta A = 0,001$ gesteigert.

— Das Diodenzeilen-Spektrometer erlaubt nur die

Vermessung optisch einwandfreier Proben, ähnlich wie konventionelle Doppelstrahl-Spektrophotometer, die den Strahlengang nicht stören. Die hinter der Probe vorgenommene Dispersion (im Gegensatz zur herkömmlichen Technik) schließt die Vermessung trüber, optisch dichter Proben prinzipiell aus und erhöht den Streulichtanteil, der wiederum die Auflösung verkleinert. Nur Proben kleiner als $A = 7$ und (bei Blitzlichtbestrahlung größer als $A = 0,1$) können vermessen werden.

— Diodenzeilen sind teurer als Photovervielfacher. Der Ausfall von Einzeldioden des Arrays macht dieses unbrauchbar.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist, die obengenannten Nachteile herkömmlicher scannender Spektrophotometer — vornehmlich von Doppelstrahl- und Diodenarray-Spektrometern — zu vermeiden und deren Spezifikationen möglichst zu erhalten oder gar zu übertreffen. Die Aufgabe wird durch strikte Einstrahlbarkeit (Abb. 2, Mitte) gelöst, und zwar dadurch, daß der aus einer Beleuchtungsoptik (Abb. 1, Pos. 1–5) kommende Lichtstrahl von einem neuartigen lichtstarken Monochromator (15) dispergiert wird und mit Hilfe einer Zylinderoptik (6, 11, 12) senkrecht von oben auf eine Spezialküvette (13) fokussiert wird, die unmittelbar über dem Lichtdetektor angebracht ist, der das Lichtsignal in ein elektrisches Signal transduziert, welches schließlich über ein Interface und einen schnellen A/D-Wandler in einen geeigneten Rechner eingegeben und programmgesteuert aufbereitet wird.

Die Bestrahlungsoptik (1–4) ist in weitgehend konventioneller Weise aufgebaut und hat die Aufgabe, das Lampenlicht (1) möglichst effizient zu nutzen. Neu ist, daß die unmittelbar vor dem Eingangsspalt stehende Kondensorlinse (5) als Zylinderlinse ausgebildet ist und das Lampenlicht "strichförmig" und nicht kreisförmig, wie üblich, auf dem Eingangsspalt (7) fokussiert.

Eingangsspalt (7) und Ausgangsspalt (11) werden in bekannter Weise entweder als Festspalt oder variabel ausgeführt. Neu ist die Computer-gesteuerte, mechanische Einführung eines feinen Metall-Maschennetzes mit bestimmtem Steg/Lückenverhältnis, d. h. definierter Transmission, vornehmlich zwischen Zylinderlinse (5) und Eingangsspalt (7) zur weitgehend wellenlängenunabhängigen Eichung der Absorption. Im Gegensatz zu herkömmlichen Graufiltern unterliegt ein solches Netz praktisch keiner Alterung (Bleichen!) und zeigt keine meßbare Wellenlängen-Abhängigkeit.

Analog zur Absorptionseichung läßt sich die Wellenlänge mit einem automatisch einzubringenden, scharfbandigen Filter (wie Neodym oder Didymium) eichen. Wahlweise ist die Wellenlängeneichung über evtl. vorhandene Spektrallinien der jeweils benutzten Meßlampe (1), etwa einer Deuteriumlampe, durchzuführen. Bei Verwendung linienfreier Lampen, wie etwa einer Halogenlampe, besteht die Möglichkeit, eine scharfbandige Zusatzlampe, wie etwa ein preiswertes Neon-Glimmlämpchen, ständig "mitlaufen" zu lassen, um so — software gesteuert — über die genau bekannten Wellenlängen dieser Emissionslinien, eine präzise Simultaneichung zu erreichen. Bei Verwendung von mehr als zwei Linien mit genügendem Abstand ist darüber hinaus die Linearität des Monochromators leicht zu überprüfen, bzw. eine Linearisierung bzgl. Wellenlänge oder Wellenzahl (Energie) durchzuführen. Derartige Simultaneichungen sind nur mit einer Einstrahl-Anordnung — wie hier beschrieben — möglich, weil eine Lampen-Kom-

pensation wie bei den Doppelstrahl-Spektrometern fehlt. Es ist darum bislang Praxis der Hersteller, die Wellenlängen-Eichung mechanisch permanent vorzunehmen, notwendigerweise routinemäßig zu überprüfen und gegebenenfalls neu einzustufen. Abweichungen von 1–2 nm vom Absolutwert sind typisch.

Entsprechend dem vorgegebenen Strahlengang trifft der weiße Lichtstrahl unter einem geeigneten Winkel α (gegenüber der Gitternormalen), der mittels einer (nicht im Bild 1 gezeigten) Vorrichtung einjustiert werden kann, derart auf das (vornehmlich konkave) feststehende Streugitter (8) auf, daß das (monochromatische) Streulicht erster Ordnung (Keil γ in Abb. 1, vgl. Abb. 9) genau auf ein ablenkendes optisches Element, z. B. einen Spiegel (9), oder — zwecks Auflösungssteigerung — auf ein Prisma als zweitem dispergierendes Element fällt, und mittels eines Computer-gesteuerten Mechanismus¹⁰ (10), etwa einem Stepmotor, einem Winchester (Drehspul-)Laufwerk, einem Rotationsvibrator oder einem freilaufenden Motor mit Triggermechanismus, im Millisekundenbereich über den Ausgangsspalt (11) bewegt wird. Gemessen am Gesamtkreis von 360 Grad wird bei den üblicherweise eingesetzten Streugittern nur ein geringer Winkelbereich (z. B. 15 Grad) effektiv genutzt, welcher dem Streulicht erster Ordnung entspricht, bei vorgegebenem "Blazewinkel" (Winkel maximaler Emissions-Intensität). Man kann natürlich auch das Gitter selbst (8) drehen (wie in konventionellen Spektrophotometern über eine Schnecke mit Zahnrad, Minutenbereich!), und das Ablenkelement (9) starr anordnen. Dabei ist jedoch das bzgl. der Wellenlänge nutzbare Streulicht auf einen entsprechend kleineren Winkelbereich (im Beispiel also 15 Grad) beschränkt, und die effektive Meßzeit pro Gitter-Umdrehung entspricht dann dem $15/360$ ten Teil, das sind etwa 4% pro Umdrehung. Das bedeutet eine inökonomische Licht- und vor allem Zeitnutzung, womit der hier vorgestellten Konfiguration, d. h. Drehung von Element (9) bei festem Gitter (8), Priorität eingeräumt wird.

Als Alternative zur Gitterkonfiguration bietet sich der Einsatz eines drehbaren Prismas in Pos. 9 (Abb. 1, Nebenbild) als alleinigem dispergierendem Element an. Der Nachteil ist die schlechter definierte und geringere Wellenlängenauflösung als beim Gitter, der Vorteil die Eindeutigkeit der Wellenlängendefinition über den gesamten Spektralbereich (150–1000 nm, kein Ordnungsproblem wie beim Gitter; vgl. Abb. 9), die höhere Lichtstärke und der weit niedrigere Preis eines Prismas gegenüber einem Streugitter. Die früher bei Prismen als nachteilig angesehene nichtlineare Abhängigkeit der Wellenlänge vom Dispersionswinkel läßt sich über bekannte Spektrallinienabstände mittels on-line Mikrocomputer leicht eliminieren.

Charakteristisch für die hier benutzte Anordnung ist der senkrechte Strahlengang durch die Küvette (13), also parallel zur Gravitation (wenngleich die konventionelle waagerechte Anordnung möglich bleibt). Der Vorteil dieser Anordnung ist vielfältig, es werden völlig neue, bisher unbekannte Anwendungsbereiche erschlossen: So lassen sich feste Proben wie Blätter, Blüten, Gewebe aller Art, Schlämme, Papiere, Folien u. v. a. m. spektral vermessen, indem man diese unmittelbar (etwa über einer entsprechenden Lochblende zur Strahleingrenzung) über dem Photodetektor plaziert, also keine besondere "Küvette" benötigt. Bei "unzugänglichen" oder "gefährlichen" Proben lassen sich aufgrund der hohen Lichtstärke des Monochromators Meßlicht und Signallicht mittels geeigneter Lichtleiter-

Fasern über weite Strecken führen. Die wellenlängenabhängige Dämpfung von Lichtleitfasern beträgt im sichtbaren Spektralbereich etwa 10 dB/km, die Rayleighstreuung etwa die Hälfte davon, also bzgl. der Spektrenverzerrung vernachlässigbare Werte bis in den 100 m Längen-Bereich.

Kolorimetrische Messungen an stark streuenden oder optisch sehr dichten Proben werden so möglich, ein Problem, dem man bislang nur durch arbeitsaufwendige Probenfiltration beikommt. Flüssige Proben — klar, oder trübe Suspensionen — werden in (vornehmlich zylindrischen Edelstahl-)Küvetten (13) mit frei wählbarem Innen-Durchmesser vermessen, welche unmittelbar über dem Photodetektor (vornehmlich ein "end-on" Photovervielfacher) angebracht und nur mit einem Boden-Fenster abgeschlossen sind, an welches keinerlei optische Qualitätsanforderungen gestellt werden, und welches z. B. aus Plexi- oder Fensterglas besteht; natürlich sollte es für Messungen im Ultraviolett-Bereich unlich sollte es für Messungen im Ultraviolett-Bereich innerhalb 370 nm für diesen durchlässig sein (für trübe Proben aus physikalischen Gründen ohnehin irrelevant): in diesem Fall bietet sich ein relativ preiswertes Quarzfenster von etwa 1 mm \times 10 mm Durchmesser an — verglichen mit teuren "Gesamtquarküvetten" der Standardform, die etwa die 15fache Menge an Quarzglas erfordern. Die Anordnung ist unempfindlich gegenüber Verschmutzungen, die insbesondere bei kolorimetrischen Messungen einen durch Streuung verfälschenden Einfluß auf das Ergebnis ausüben, aber bei Messungen unter "unvorteilhaften" Bedingungen (Feldanalyse!) kaum zu vermeiden sind.

Die große Nachweisempfindlichkeit zur Vermessung optisch dichter, trüber Proben wird insbesondere durch den geringen Abstand von nur wenigen Millimetern zwischen Probe und Detektor, vornehmlich einem Photovervielfacher, erreicht (vgl. mit etwa 20 cm in herkömmlichen Zweistrahlgeräten). Dies resultiert aus einem erfaßten Raumwinkel von über π ($\approx 3,14$) Steradian, während konventionelle Doppelstrahl- oder Diodearray-Spektrometer Raumwinkel von nur etwa 0,002 Steradian erfassen (vgl. Abb. 3).

Mit dieser Küvettenanordnung ist ferner eine vorteilhafte Optimierung von durchstrahlter Schichtdicke und Probenquerschnitt bei vorgegebenem Probenvolumen möglich. Denn das Absorptionssignal ist proportional zur Schichtdicke, die bei allen herkömmlichen Spektrometern grundsätzlich auf 1 cm fixiert ist; d. h. die Probe muß der Küvette angepaßt werden, und nicht umgekehrt, eine oftmals ernsthafte Beschränkung: Es ist bislang gängige Routine, Proben zwecks Vermessung entlang zu verdünnen, oder aber einzuengen. Letzteres ist nicht immer möglich, womit sich in dem Fall eine spektrale Vermessung auf einem konventionellen Spektrometer verbietet.

Aus physikalischen Gründen ist die Form des Lichtstrahls, der den Monochromator verläßt (Spalt 11, Abb. 1) spaltförmig, mit einer Ausdehnung von etwa 3 \cdot 20 mm. Da der Querschnitt der verwendeten Küvetten (13) kreisförmig ist, gewinnt man durch Kompression des spaltförmigen Ausgangsstrahls in Längsausdehnung mittels einer Zylinderoptik (12) auf etwa 3 \cdot 3 mm den mindestens 6fachen Lichtfluß, was die Nachweisgrenze bei der Messung optisch dichter Proben entsprechend absenkt.

Die Innenbohrung der Küvette (13) wird vollständig vom Meßstrahl durchsetzt, so daß das gesamte Probenvolumen in die Messung eingeht, während bei konventioneller Strahlanordnung und herkömmlichen Küvet-

7
ten effektiv etwa nur 20% der Gesamtsubstanz vermessen werden, womit im vorliegenden Fall die Nachweisgrenze nochmals um eben diesen Faktor abgesenkt, bzw. das Signal-Rauschverhältnis entsprechend gesteigert wird (herkömmliche Küvetten stellen dem Meßstrahl von ca. 3 · 20 mm eine Meßfläche von 10 × 30 mm entgegen). Darüber hinaus können Minimalvolumina bis hinunter zu etwa 5 µl — klar oder trübe — ohne zusätzlichen Aufwand (etwa einer abbildenden Mikroskop-Optik) vermessen werden, z. B. als Tröpfchen über einer Lochblende aufgetragen oder als Festkörper wie einer einzelnen Koleoptile (Keimscheide von Gräsern, ein zentrales Forschungsobjekt der Pflanzenphysiologie) lichtdicht in eine entsprechende Blende gepreßt, während herkömmliche Küvetten lediglich klare Proben mit Volumina von etwa drei Millilitern erfordern, kostspielige "Sparküvetten" immerhin noch etwa 0,5 ml als untere Standardgrenze.

Tieftemperaturmessungen, etwa bei der Temperatur flüssigen Stickstoffs (−196°C), können einfach, schnell und routinemäßig durchgeführt werden. Der Zeitaufwand für eine Messung beträgt insgesamt nur wenige Minuten, während man bei herkömmlichen Spektrophotometern erfahrungsgemäß etwa eine Stunde pro Spektrum veranschlagen muß (Umrüstung und Probenpräparation), was "Routinemessungen" weitgehend ausschließt. Die (vornehmlich aus Edelstahl gefertigten) Küvetten können dabei in einem kleinen, nach oben offenen Dewar mit durchsichtigem (nichtversilbertem) Boden, an den keine optische Qualitätsanforderungen gestellt werden, innerhalb etwa einer Minute auf −196°C abgekühlt und mit einer Füllung länger als 10 Minuten vermessen werden. Abb. 4 zeigt als Beispiel das Absorptionsspektrum einer farblosen Pigmentmutante des Brotschimmels *Neurospora crassa* bei −196°C, welche etwa eine Extinktion (= Streuung + Absorption) von $E = 4$ und eine reine Absorption von $A = 0,4$ hat. Hieraus wurde zur Auflösungssteigerung die vierte Ableitung nach bekannter Methode berechnet, in der sich eine Reihe bekannter Pigmente, vornehmlich Cytochrome der Atmungskette, widerspiegelt. Ein paar der wesentlichen Neon-Eichlinien sind eingezeichnet (Abb. 4).

Viele hundert Spektren lassen sich so sukzessive erfassen und entweder in Form einer "kinetischen 3-D-Darstellung" versetzt abbilden, oder zwecks Auflösungssteigerung bei sich nicht ändernden Proben mitteilen (das Signal-Rausch-Verhältnis wächst in bekannter Weise mit der Wurzel der Spektrenzahl). Wiederum stört — wie etwa bei Tieftemperaturmessungen mittels konventioneller Doppelstrahl-Spektrophotometer der Fall — die große optische Dichte tiefgefrorener Proben nicht, ein (klares) "Glas" und dessen aufwendige Präparation sind nicht erforderlich; ebensowenig eine Referenz-Tieftemperaturküvette, verbunden mit größerem Präparations- und "Hardware"-Aufwand (zweiter Photomultiplier und erforderliche Nachfolgeelektronik) wie bei herkömmlichen Spektrophotometern der gehobenen Preisklasse. Glasklare Proben sind nicht einmal erwünscht, da die Streueigenschaften nicht-glasartig tiefgefrorener Proben mit einem typischen "Streufaktor β " von mehr als 20 das Meßsignal entsprechend vergrößern, oder anders formuliert, eine entsprechend kleinere Konzentration zu messen gestatten (vgl. Messung mit streuendem Material). Wieder reichen wesentlich geringere Substanzmengen als bei herkömmlichen Zweistrahl-Spektrophotometern aus. Spektrenverarbeitung wie "Derivative-Spektroskopie" erlaubt eine schnelle,

einfache Informationsgewinnung besonders anhand optisch "schwieriger Proben" in bisher unbekanntem Ausmaß.

Eine weitere Möglichkeit der Empfindlichkeitssteigerung des vorgestellten Spektrometers bietet sich aufgrund der theoretischen Arbeiten von Butler (vgl. Absorption of Light by Turbid Materials, J. Opt. Soc. Am., 52, 292–299, 1962) an. Durch Präparation einer Paste aus einer klaren zu vermessenden Lösung und CaCO_3 ("slurry") läßt sich die apparente Absorption um einen Faktor β von bis zu 20 erhöhen. Unumgängliche Voraussetzung ist die Verwendung eines lichtstarken Einstrahlspektrometers mit "end-on" Photomultiplier. Mit herkömmlichen Zweistrahlgeräten ist diese Methodik nicht anwendbar.

Beim konventionellen Zweistrahl-Spektrophotometer erreicht man — wie ausgeführt — die Kompensation der apparateigenen Dispersion durch Vergleich der Signale von Probe und Referenz gemäß der Definition der Optischen Dichte $A = \log I_0/I$. Für die Einstrahlanordnung bieten sich folgende Lösungen an: Einmal läßt sich der Apparateresponse (Eigendispersion) permanent im on-line Rechner abspeichern, vorausgesetzt die zu messende Probe ist klar und nicht streuend. Dieses Verfahren hat man in den (ebenfalls einstrahligen) Diodenarray-Spektrophotometern gewählt, da diese ohnehin nur klare Proben zulassen. Eine wesentlich elegantere Lösung stützt sich auf eine theoretische Arbeit von P. Kubelka (J. Opt. Soc. Am. 38, 448, 1947). Er konnte nämlich zeigen, daß für klare, nicht streuende Proben, bei Verwendung diffusen, d. h. nicht-kollimierten Meßlichts, die apparente optische Dichte um den Faktor 2 (zwei) ansteigt. Die vorliegende Anordnung des Photodetektors gestattet ohne Einschränkung die Verwendung diffusen Meßlichts, was in konventionellen Spektrophotometern, insbesondere dem Diodenarray-Spektrometer, wegen des hohen Lichtverlustes nicht möglich ist (kein Meßstrahl!). Hierfür bietet sich einmal die Vorschaltung einer gewöhnlichen Streuscheibe vor den Eingang der Küvette an, welche allerdings den Nachteil hat, daß ein Teil des Meßlichts verloren geht und die Probe gar nicht erst erreicht. Eine bessere Lösung ist die Verwendung einer Streulinse mit geeigneter (negativer) Brennweite, welche den Strahl nahezu vollständig diffus macht, was in Abb. 5 durch die Strahlengänge "p" und "s" angedeutet ist. Die Linse kann wiederum computergesteuert vor die Probe gefahren werden, so daß ohne manuelle Eingriffe in die Probenkammer, etwa Auswechseln der Küvette durch eine Referenzküvette, ein Referenzspektrum gefahren werden kann, womit eine Berechnung der korrigierten Absorption durch den on-line Computer möglich ist, und zwar für jede Probe individuell. Die Tatsache, daß ein und dieselbe Küvette ohne zwischenzeitliche Berührung (!) Probe und Referenz darstellt, senkt die Nachweisgrenze beträchtlich, wie Untersuchungen von J. O. Erickson und T. Surles (American Lab., 1976, 41–45) gezeigt haben.

Stark streuende, trübe Proben machen von sich aus das zuvor gut kollimierte Meßlicht diffus, womit die oben beschriebene Methode hierfür wirkungslos wird. Darüber hinaus ist für stark streuende Proben die permanente Abspeicherung einer "Korrekturkurve" jedoch auch nicht sinnvoll, da — entsprechend der Theorie von Rayleigh — praktisch jede streuende Probe ein ganz individuelles, wellenlängenabhängiges Streuverhalten zeigt, welches experimentell bestimmt werden muß. Hier bietet sich ein sehr wirkungsvolles Verfahren an, welches sich beim Anmelde experimentell bewährt hat,

andererseits komplex und theoretisch noch wenig durchleuchtet ist. Es zeigt sich nämlich, daß sich bei Schichtverdopplung ausreichend dicker, stark streuender Proben das "Streuspektrum" (apparentes wellenlängenabhängiges Extinktionssignal eines Streuers ohne Absorber) in seiner Form praktisch nicht ändert, sondern lediglich (log-Skala!) um einen bestimmten Betrag verschoben wird, einen "offset" erleidet.

Um also das streukorrigierte Absorptionsspektrum etwa eines grünen Laubblattes zu bestimmen, mißt man lediglich die unkorrigierten Spektren je von einem und von zwei dicht übereinander liegenden Blättern und subtrahiert diese voneinander. Für eine flüssige, stark streuende Probe, etwa eine Suspension, verwendet man analog dazu die in Abb. 6 konzipierte Küvette, bei der ein Verdrängungskörper, etwa ein ferromagnetischer Hohlzylinder (mit chemisch inerte Beschichtung), von einer besonderen Vorrichtung, z. B. einer Magnetspule, in die flüssige Probe, vornehmlich Computer-gesteuert über eine Magnetspule, eingetaucht werden kann, womit sich im wesentlichen die durchstrahlte Schichtdicke verändert, aber die sonstige Probengeometrie weitgehend unbeeinflusst bleibt. Auf diese Weise läßt sich ein Referenzstrahlengang für jede individuelle Probe schnell und automatisiert realisieren und das korrigierte Absorptionsspektrum ermitteln (theoretisch begründbare Änderungen von Absorptionsspektren durch Streueffekte, etwa Peakverbreiterungen, sind dem Fachmann bekannt, gut untersucht, dem Problem inhärent und in diesem Zusammenhang unerheblich).

Die Kolorimetrie beschäftigt sich mit der optischen spektralen Vermessung von an sich farblosen Substanzen, die insbesondere für die Umweltanalytik (z. B. Wasser-, Abwasser- und Schlamm-Analytik) eine Rolle spielen. Für eine große Zahl verschiedenster chemischer Komponenten existieren hochspezifische Reagenzien, die aufgrund einer bestimmten Farbreaktion mit der zu analysierenden Komponente (vornehmlich Komplexbildner von Übergangsmetallen) deren quantitative Bestimmung erlauben. Diese Nachweise sind für viele Metalle oftmals preiswerter und der sehr viel aufwendigeren Atom-Absorption oder -Emissionsspektroskopie vorzuziehen (vgl. "Spektrometrische und Chromatographische Methoden in der Umweltanalytik", Hubert Hein, 1984, Laborpraxis). Eine wesentliche Verbesserung der Meßgenauigkeit konnte bislang durch (Einzel-)Bestimmung der Absorptionswerte an zwei Wellenlängenpositionen erreicht werden. Auf diese Weise lassen sich Streuung und Absorption durch Fremdkomponenten besser eliminieren, wenn nur der spektrale Überlapp dieser Komponenten mit der fraglichen Absorption nicht zu groß ist. Darüber hinaus ist es möglich, durch Zweiwellenlängenanalyse zwei Komponenten kolorimetrisch nebeneinander zu bestimmen, z. B. CuSO_4 und NiSO_4 mit Absorptionen bei 800 und 720 nm.

Das hier vorgestellte Spektrophotometer erlaubt eine noch weitergehende Verbesserung kolorimetrischer Messungen, einmal dadurch, daß wesentlich geringere optische Qualitätsanforderungen an die Probe gestellt werden (trübe, streuend, mäßige Verschmutzung akzeptabel), zum andern dadurch, daß das gesamte Spektrum zwecks Mehrkomponentenanalyse (mehr als zwei Komponenten) schnell zur Auswertung gelangt. Dieses erfordert zwar einen vergleichsweise großen mathematischen Aufwand, verglichen mit der kolorimetrischen Bestimmung nur einer oder zwei Komponenten mittels der Zweiwellenlängenmethode, vornehmlich Konvolution/Dekonvolution, Fourieranalyse und Matrizenrechnung,

der jedoch durch den on-line Rechner mit entsprechender Programmierung routinemäßig zu bewältigen ist.

Insbesondere eignet sich der neue Monochromator zur fluorimetrischen kinetischen(!) Bestimmung von Ca^{2+} in vivo (sehr aktuell, da "second messenger" in der biochemischen Signalverarbeitung) und in vitro mittels der Fura II-Methode anhand zweier Wellenlängen im Fluoreszenz-Anregungsspektrum (der Ca^{2+} -Komplex von FURA II und FURA II selbst haben unterschiedliche Absorptionsspektren mit Maxima bei 340 und 380 nm). Die beiden bislang für diesen Zweck verfügbaren Spektrophotometer sind verhältnismäßig teuer (DM 130 000.— bzw. 170 000.—) und vom technischen Aufwand her fragwürdig (Firmen SIGMA und SPEX: zwei Photomultiplier, zwei Monochromatoren, Blockieren des Anregungslichtes durch intrinsisch fluoreszierende Blockfilter, Beschränkung auf klare Proben, OD-Werte nur an zwei Wellenlängenpositionen und nicht zwei Spektren dienen der Analyse).

In der Intensivmedizin, der Anästhesie, der ärztlichen Operationspraxis und der medizinischen Notfallversorgung ist die Kenntnis der aktuellen Sauerstoffsättigung des Blutes von großer Bedeutung. In der Praxis geschieht das durchweg invasiv; d. h. Blut wird mittels einer Spritze entnommen und die Sauerstoffsättigung entweder polarographisch (Sauerstoffelektrode) oder spektral über die verschiedenen Absorptionsspektren von Hämoglobin (reduziert) und Oxyhämoglobin (oxidiert) bestimmt (vgl. Abb. 7, oben). Mit Hilfe einer "end-on" Photomultiplier-Anordnung läßt sich das Blut in vivo spektral erfassen, wie Abb. 7, unten, für eine menschliche Hand gezeigt. Das gemessene Spektrum resultiert aus der Überlagerung der beiden Extremspektren (reduziert/oxidiert). Durch Koeffizientenvergleich der beiden anteiligen Konzentrationen läßt sich so die aktuelle Sauerstoffsättigung nichtinvasiv bestimmen. Mittels eines Lichtleiters wird das Licht vom Monochromator (15) an das durchblutete, möglichst dünnwandige Meßobjekt, etwa Ohrfläppchen, Finger oder Hautfalten, herangeführt, und das durchgestrahlte Licht durch einen zweiten Lichtleiter, etwa in Form eines Clips, wieder zum Detektor abgeführt. Wahlweise kann ein Halbleiterdetektor direkt mit Vorverstärker in den Clip eingebaut und das Meßsignal niederohmig elektrisch abgeleitet werden (Abb. 8).

Das hier vorgestellte Einstrahl-Absorptionsspektrophotometer läßt sich ebenfalls als "schnelles" Reflexionsspektrophotometer einsetzen, womit sich der Anwendungsbereich auf Oberflächenmessungen aller Art erweitert. Zu diesem Zweck wird ein verzweigter, zweiarmer Lichtleiter verwendet, dessen einer Arm das Meßlicht am Ausgangsschlitz des Monochromators (genauer: im Brennpunkt Nähe Pos. 13, Abb. 1) über eine geeignete Optik abgreift und auf die Probe strahlt, und dessen zweiter Arm das reflektierte Licht von dort dem Detektor (14) zuführt. Die Korrektur der Geräte-intrinsischen Dispersion geschieht — durch den on-line Rechner gesteuert — wie üblich in der Reflexionsspektroskopie durch weiße, nicht-fluoreszierende Materialien wie z. B. Zinkoxid.

Mittels einer geeigneten abbildenden Teleoptik lassen sich spektrale Fernmessungen an nichtleuchtenden Körpern in Reflexion, an selbstleuchtenden Körpern (Lumineszenz von Meeresbakterien oder Laubblättern; Lampen, Flammen) unmittelbar durchführen.

Aufgrund der großen Geschwindigkeit und Speicherkapazität heutiger Mikrocomputer ist es vorteilhaft, entgegen dem üblichen Vorgehen den gesamten von der

Drehkomponente (Abb. 1, Pos. 9) erfaßten Spektralbereich, und den gesamten vom Detektor erfaßten (und typischerweise über viele "scans" gemittelten) Absorptionsbereich, "on-line" mit hoher Dynamik (z. B. 16 Bit nach beendeter Akkumulation, der A/D-Wandler darf weniger Bit haben, z. B. nur 8, was den Verstärkeraufwand reduziert) aufzuzeichnen, und erst nachher ("off-line") zu entscheiden, welcher Wellenlängen- und Absorptionsbereich letztendlich selektiert und gespeichert werden soll (im Gegensatz zum heute durchweg üblichen Verfahren bei Doppelstrahl-Spektrophotometern, bei welchen die Vorwegauswahl essentiell, doch für die hier vorgestellte Erfindung unmaßgeblich ist). Dieses Vorgehen verringert den hardware-Aufwand beträchtlich. Das Spektrometer wird weitgehend vom Rechner (Tastatur) kontrolliert. Alle zeitkritischen Rechnungen ("real time") sowie die on-line Datenerfassung werden in Maschinensprache (assembler) durchgeführt (z. B. in Verbindung mit der CPU 68 000 von Motorola in Form eines Einplatinencomputers).

Das Sektorenrad ("chopper"), welches im herkömmlichen Doppelstrahl-spektrometer Meß- und Referenzstrahl über die Phaseninformation mittels eines "lock-in Verstärkers" diskriminiert (Abb. 2), und das typischerweise mit einer Drehzahl von 50–60 Herz umläuft, entfällt, was den Spektrometernaufbau entscheidend vereinfacht, verbilligt und robuster macht. Das Signal hat reinen DC-Charakter, Rauschkomponenten werden minimiert, das Signal-Rauschverhältnis (signal to noise ratio, "SNR") wird deutlich verbessert. Für Sonderaufgaben lassen sich Meßlampe und A/D-Wandler darüber hinaus aus einem Akku betreiben, was jegliche Netzstörungen ausschaltet und das Signal-Rauschverhältnis maximiert. Ganz wesentlich jedoch ist nun, daß die Meßgeschwindigkeit — entsprechend der Forderung eines Theorems der Signalverarbeitung — nicht mehr durch die "Chopperfrequenz" limitiert wird. Der bekannte "tracking-error" herkömmlicher Spektrophotometer entfällt völlig. Der on-line Rechner ist die Geschwindigkeits-limitierende Größe; in Verbindung mit einem schnellen Mikrocomputer erreicht man gegenüber herkömmlichen Zweistrahlsspektrophotometern eine etwa 5×10^4 -fache Meßgeschwindigkeit, die vergleichbar ist mit der von Diodenarrayspektrometern, jedoch bei weit höherer Auflösung bzgl. Wellenlänge und Absorption und weiteren oben erwähnten Vorteilen.

Die vorliegende Erfindung impliziert bei nicht-zeitkritischen Messungen die Möglichkeit des routinemäßigen "averaging": Eine schnelle Programm-Routine vergleicht jeweils zwei zeitlich aufeinanderfolgend aufgenommene Spektren, wobei das letztere immer nur dann akzeptiert wird, wenn die Differenz zum (zu den) vorhergehenden einen vorgegebenen Maximalwert unterschreitet; ansonsten wird es verworfen. In "real-time" wird das "Wachsen" des Spektrums auf einem Sichtgerät (Computerbildschirm) sichtbar gemacht und die Messung bei gewünschter Güte (Signal-Rausch-Verhältnis) beendet. Dieses Verfahren erlaubt eine weitere Steigerung der Signalauflösung.

Wahlweise lassen sich sequentielle Spektren versetzt in einer "Quasi-3D-Darstellung" zur spektralen — nicht nur der üblicherweise punktuellen — Aufnahme von Kinetiken darstellen, auch von stark streuenden ("trüben") Proben, was bislang mit keinem Spektrophotometer möglich ist. Dieses erschließt neue Fragestellungen, etwa in der Photosynthese-Forschung oder der Umwelt-Analytik (spektrale Änderungen von kurzlebigen Intermediären).

Die bei reiner DC-Verstärkung immer auftretende "baseline-drift" ist im vorliegenden Fall irrelevant, da gering und langsam: diese erzeugt ohnehin — aufgrund der vergleichsweise hohen Scangeschwindigkeit — lediglich einen "offset", der bei der Berechnung von $A = \log I_0/I$ entfällt. Der Logarithmus wird nicht wie üblich über einen gesonderten Baustein bestimmt, sondern in Maschinensprache errechnet; damit umgeht man das bekannterweise störende "Einschwingverhalten" von logarithmischen Verstärkern und spart ein teures Bauteil ein.

Der hier vorgestellte Einstrahlsspektrophotometer vereinigt eine Reihe von Vorteilen gegenüber herkömmlichen Spektrophotometern, insbesondere von Geräten zur kontinuierlichen Messung ganzer Spektren, also Doppelstrahl- und Diodenarray-Spektrophotometern, aber vermeidet deren Nachteile. Strikte Einstrahligkeit und eine rigorose Verlagerung von "hardware-" auf "software-" Komponenten gestatten einen einfachen, preiswerten, robusten und wenig anfälligen Aufbau, der flexibel und anwendungsbezogen gestaltet werden kann. Gleichzeitig entfällt die gravierende Zeitlimitierung des konventionellen Doppelstrahl-Spektrometers. Spektren können im Millisekundenmaßstab ermittelt werden; aufgrund der besonderen Anordnung der Einzelkomponenten ist die spektrale Vermessung optisch dichter, und/oder stark streuender Proben möglich: die Effizienz der Lichterfassung bei stark streuenden Proben ist um mindestens einen Faktor von 10^4 gegenüber herkömmlichen Spektrometern gesteigert. Probenvolumina von wenigen μl und winzige Festproben im Millimetermaßstab können spektral vermessen werden, während konventionelle scannende Spektrophotometer klare Proben, d. h. Lösungen, von 3, mindestens aber 0,5 ml erfordern. Tieftemperaturspektren lassen sich schnell und routinemäßig durchführen.

Korrektur der Geräte-eigenen Dispersion sowie Eichung bzgl. Absorption und Wellenlänge sind ebenfalls Teil der Erfindung. Charakteristisch ist der senkrechte Strahlengang durch die Küvette und die "end-on" Anordnung des Photodetektors. Die Lichtstärke des Monochromators wurde unter gleichzeitiger Reduktion des Streulichtanteils signifikant gesteigert. Durch neuartiges Zusammenschalten an sich bekannter opto-elektronischer Bauelemente mit einem one-line Mikrocomputer konnte ein Spektralphotometer hoher Flexibilität mit bislang unerreichten Spezifikationen und einem hervorragenden Preis-Leistungsverhältnis konzipiert werden.

Legenden zu den Abbildungen

Abb. 1a. Schematischer Aufbau des Monochromators in der Gitterversion (perspektivisch). (1) Halogenlampe, (2) Kondensorspiegel, (3) Kondensorlinse, (4) Hitzeabsorptionsfilter, (5) Zylinderlinse am Eingangsspalt, (6) Ablenkspiegel, (7) Eingangsspalt, (8) Beugungsgitter, (9) drehendes Ablenkelement, z. B. Spiegel, (10) Drehvorrichtung, (11) Ausgangsspalt, (12) Zylinderlinse am Ausgangsspalt, (13) vertikale Spezialküvette, (14) Photodetektor, (15) Monochromatorgehäuse, (f) Streukeil erster Ordnung, (s) Streukeil zweiter Ordnung.

Abb. 1b. Schematischer Aufbau des Monochromators in der Prismenversion. (L) Sammellinse. Restliche Bezeichnungen wie in Abb. 1a.

Abb. 2. Die drei wesentlichen Typen eines Spektralphotometers (hier als Absorptionsphotometer skizziert). Oben: Konventionelle Doppelstrahlanordnung

als registrierendes Photometer, Mitte: Einstrahlphotometer für Punktmessungen (Einstellung fester, vorgegebener Wellenlängen). Unten Diodenarrayspektrometer; die Dispersion geschieht hinter der Probe. (ML) Meßlampe, (Mo) Monochromator, (Mot) Motor, (HM) halbdurchlässiger Spiegel, (M) Spiegel, (S) Probe, (R) Referenzprobe, (PM) Photovervielfacher, (CH) Unterbrecherscheibe, (Mikro) Mikrocomputer, (Log) logarithmischer Verstärker, (Lock-in) Phasenselektiver Verstärker.

Abb. 3. Vergleich der Strahlengänge von typischem Zweistrahlspektrophotometer und dem hier vorgestellten Einstrahlphotometer mit "end-on" Photovervielfacher. (I_0) einfallendes Licht, (I_r) reflektiertes Licht, (I_p) paralleles Licht, (I_a) absorbiertes Licht, (I_s) gestreutes Licht, (PM) Photovervielfacher. Der Unterschied in der Größe der erfaßten Raumwinkel ist angedeutet.

Abb. 4. Oben: Streukorrigiertes Absorptionsspektrum einer optisch sehr dichten, tiefgefrorenen Probe (Myzel des Brotschimmels *Neurospora c.*), aufgenommen mit dem angegebenen Spektrometer. Unten: Vier Ableitung obigen Spektrums zur Auflösungssteigerung. Eingetragen sind als Beispiel die wichtigsten Neonlinien, die der Wellenlängeneichnung dienen.

Abb. 5. Vertikalküvette mit Diffuser, z. B. einer Streulinse (S), welche z. B. Computerkontrolliert in den Strahlengang gebracht werden kann. (I_0) einfallendes, paralleles Licht; (k) parallel durch die Probe verlaufendes Licht; (d) diffus durch die Probe verlaufendes Licht; (G) Küvettengrundkörper; (F) Küvettenfenster; (I) aus der Probe austretendes, zu analysierendes Licht.

Abb. 6. Vertikalküvette zur automatischen Korrektur der apparateigenen Dispersion mittels Tauchkörper. (1) Magnetspule, (2) Küvettengrundkörper (diamagnetisch), (3) Tauchkörper (ferromagnetisch).

Abb. 7. Oben: Bekannte Absorptionsspektren von Blut in oxidiertem (Oxyhämoglobin) und reduzierter Form (Hämoglobin) in vitro mit ausgezeichneten Wellenlängen. Unten: Mit angegebenem Spektrometer läßt sich in vivo das gesamte Blut-Spektrum an durchscheinenden Körperelementen, wie etwa hier einer Hand, gewinnen, woraus sich unmittelbar die aktuelle Sauerstoffsättigung nichtinvasiv bestimmen läßt.

Abb. 8. Clip zur optisch-spektralen Vermessung von Blut in vivo an durchscheinenden Körperelementen. (D) Druckpunkte zum Ankleben des Clips, (Dr) Drehpunkt, (E) elektrische Signalleitung, (F) Druckfeder, (G) Klemme aus Metall oder Kunststoff, (L) Lichtleiter, (Li) monochromatisches Bestrahlungslicht, kommend von Pos. 13 des Monochromators (Abb. 1), (O) Ohr läppchen als Beispiel, (P) Photodetektor mit Vorverstärker, (S) abgeleitetes elektrisches Meßsignal.

Abb. 9. Veranschaulichung der bekannten, hier relevanten Eigenschaften eines typischen Streugitters mittels Computergraphik. Senkrecht eingestrahktes ($\alpha = 0$), gut kollimiertes monochromatisches Licht der auf der Ordinate angegebenen Wellenlänge erzeugt unter bestimmten Winkeln (β) Streulicht (Abszisse) der verschiedenen Ordnungen. Man erkennt einmal, daß die Wellenlänge des Lichtes der ersten Ordnung maximal für nur eine Oktave wohl definiert ist, zum andern, daß typischerweise nur ein relativ kleiner Winkelbereich genutzt werden kann (vgl. "Streukeil f " in Abb. 1a).

Patentansprüche

1. Einstrahlspektrophotometer (Abb. 1), bestehend aus einer Beleuchtungsoptik, einem Monochroma-

tor und einer Abbildungsoptik, die den kollimierten, monochromatischen Lichtstrahl auf eine Küvette lenkt, und einem Photodetektor mit anschließender elektronischer Meß- und Auswerteschaltung, dadurch gekennzeichnet, daß die Beleuchtungsoptik den Meßstrahl lichtstark auf den Eingangsspalt (7) fokussiert (1-5), das Streulicht erster Ordnung (f), das durch ein feststehendes Gitter des Monochromators (15) gebildet wird, durch ein Computer-gesteuertes, Strahl-ablenkendes Element (9, 10), im Bereich zwischen .1 Millisekunden und 10. Sekunden über den Ausgangsspalt (11) bewegbar ist, der Strahlengang durch die nachfolgende Küvette (13) parallel zur Gravitation (senkrecht) verläuft, und der Photodetektor (14) unmittelbar an diese anschließt, mit einer anschließenden elektronischen Schaltung, bestehend aus A/D-Wandler, Interface und Mikrocomputer zum Aufbereiten, Ausdrucken oder Speichern des Spektrums.

2. Einstrahlspektrophotometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als dispergierendes Element einzig ein feststehendes Prisma statt Pos. 8, Abb. 1, verwendet wird (Nach Abb. 1 modifiziert, Nebenbild Abb. 1).

3. Einstrahlspektrophotometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Beleuchtungsoptik eine unmittelbar vor dem Eingangsspalt stehende Kondensorlinse (5) beinhaltet, die als Zylinderlinse ausgebildet ist, die das Lampenlicht soweit wie möglich "strichförmig" auf den Eingangsspalt (7) fokussiert.

4. Einstrahlspektrophotometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Strahl-ablenkende Element (9, 10) durch einen Mikroprozessor-gesteuerten Mechanismus aus der Gruppe Stepmotor, Winchester-Laufwerk (Drehspulmechanismus), Rotationsvibrator und freilaufender Motor mit Triggermechanismus gebildet wird.

5. Einstrahlspektrophotometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Strahl-ablenkende Element (9, 10) als Spiegel oder Prisma (als zweitem dispergierendem Bauteil) ausgebildet ist.

6. Einstrahlspektrophotometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Zylinderoptik (12) den rechteckigen Lichtstrahl, der den Ausgangsspalt (11) verläßt, in Längsrichtung komprimiert und über den Ablenkungsspiegel punktförmig auf die Küvette (13) fokussiert, die unmittelbar über dem Photodetektor (14) steht, der einen Raumwinkel von nahezu $2 \cdot \pi$ Steradian erfaßt.

7. Einstrahlspektrophotometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Abbildungsoptik unmittelbar vor dem Eintritt des Meßstrahls in die Küvette eine lichtstreuende Komponente enthält, vornehmlich eine Streulinse, oder eine Streuscheibe (Abb. 5).

8. Einstrahlspektrophotometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der zylindrische Grundkörper der Küvette aus einem vornehmlich nicht-ferromagnetischen Metall besteht, wobei die effektive Probendicke d durch einen Verdrängungskörper, etwa einen ferromagnetischen Hohlzylinder mit chemisch inerte Beschichtung, vergrößert wird, der durch eine besondere Vorrichtung, z. B. mittels einer Magnetspule, in die flüssige Probe eingetaucht wird, aber die sonstige Probengeometrie weitgehend unbeeinflusst läßt (Abb. 6).

9. Einstrahlspektrophotometer nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß ein Filter mit scharfbandigem Absorptionsspektrum, z. B. Holmium oder Didymium, zwecks Wellenlängeneichung mittels eines Schwenk-Mechanismus' in den Strahlengang gebracht werden kann, vorzugsweise vor den Eingangsspalt (7).

10. Einstrahlspektrophotometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein feinmaschiges Gewebe mit definierter optischer Transmission, vornehmlich ein schwarzes Metallnetz, in den Strahlengang gebracht wird (vorzugsweise wieder vor den Eingangsspalt 7), welches im Gegensatz zu den typischen Graufiltern praktisch keine Wellenlängenabhängigkeit im gesamten Wellenlängenbereich von 150 bis 1000 nm zeigt.

11. Einstrahlspektrophotometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Linearisierung des Drehwinkels der ablenkenden Komponente ((9), Abb. 1) bezüglich der Wellenlängen- oder Energieskala über bekannte Wellenlängendifferenzen der Spektrallinien der Meßlampe (1), Abb. 1, oder einer separaten Eichlampe, erfolgt.

12. Verfahren zur Spektrenaufnahme mit einem Einstrahlspektrophotometer nach Ansprüchen 1–11 zur Messung trüber, und/oder optisch dichter Proben, dadurch gekennzeichnet, daß das gesamte (150–1000 nm) Spektrum klarer, trüber und/oder optisch dichter Proben im Extinktionsbereich zwischen $A = 0$ bis 5 "on-line" zunächst nichtselektiv aufgenommen und gespeichert wird, während die letztlich gewünschte Skalierung bei der anschließenden Auswertung "off-line" geschieht.

13. Verfahren zur fluorimetrischen Bestimmung von Kalzium (Ca^{2+}) nach der FURA 2-Methode, nach Ansprüchen 1–12, dadurch gekennzeichnet, daß eine quasi-Simultan-Anregung der Fluoreszenz von FURA 2 bei 340 nm und 380 nm in vivo und in vitro erfolgt und die jeweils dazugehörigen Emissions-Meßwerte im on-line Computer ausgewertet werden.

14. Einstrahlspektrophotometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Küvette ersetzt wird durch einen Lichtleiter und ein durchblutetes dünnwandiges Meßobjekt, etwa ein Ohr läppchen, Finger oder Hautfalten, und einen zweiten Lichtleiter zurück zum Photodetektor. Wahlweise kann ein Halbleiterdetektor auch direkt mit Vorverstärker in den Clip eingebaut und das Meßsignal niederohmig elektrisch abgeleitet werden (Abb. 8).

15. Computer-gestütztes analytisches Verfahren zur Signal-Auflösungssteigerung von Spektren, dadurch gekennzeichnet, daß mittels eines Einstrahlspektrophotometers nach Anspruch 1–12 eine große Zahl repetitiv und im Millisekundenbereich aufgenommenener Spektren sequentiell durch Differenzbildung miteinander verglichen wird, wobei jedes individuelle Einzelspektrum nur dann akzeptiert wird, wenn die Abweichung zum (zu den) vorhergehenden Spektrum (Spektren) einen vorgegebenen Wert nicht überschreitet und abschließend sämtliche (akzeptierten) Einzelspektren zwecks Mittelung zum Gesamtspektrum aufaddiert werden.

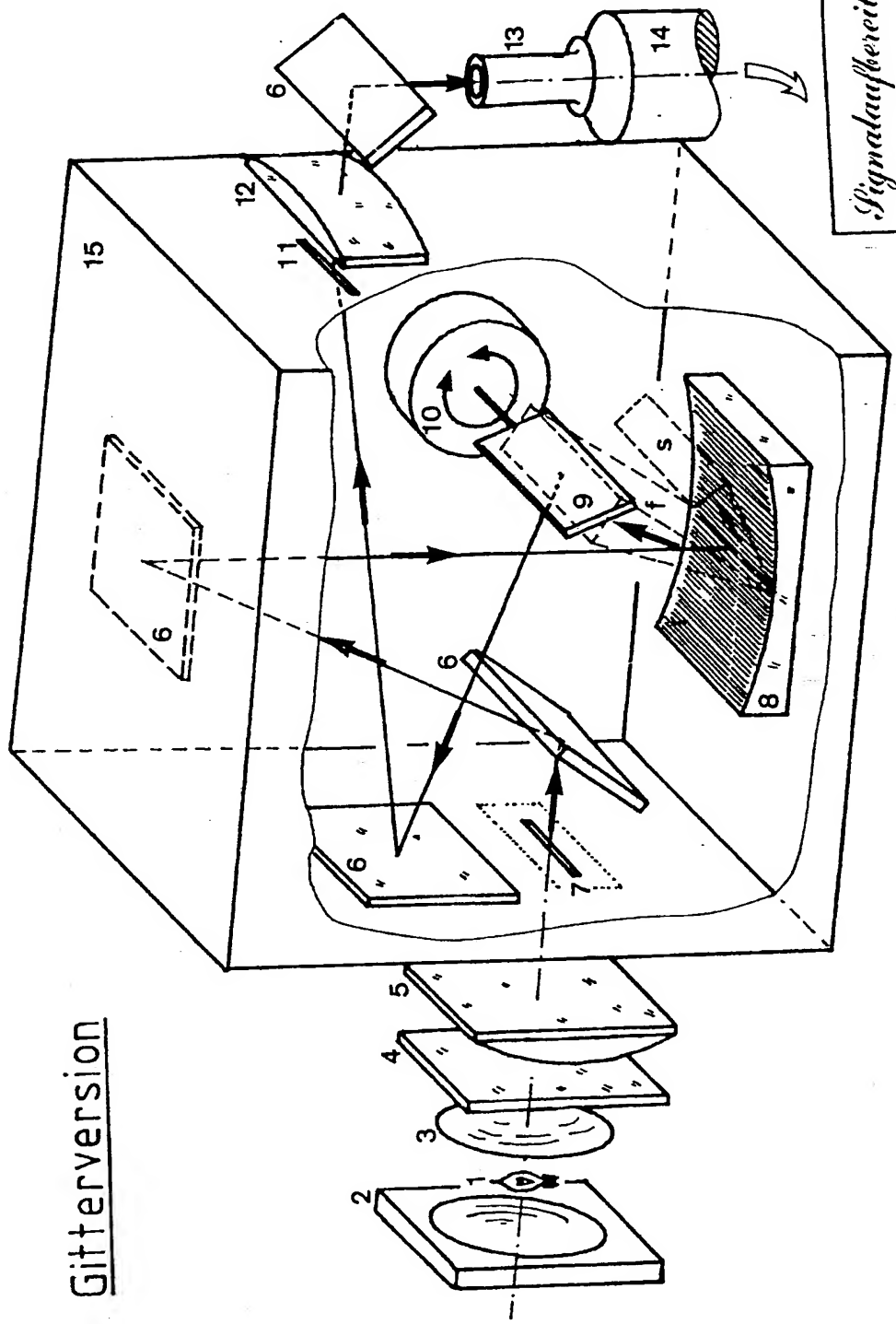
- Leerseite -

Nummer:
Int. Cl.4:
Anmeldetag:
Offenlegungstag:

37 34 588
G 01 J 3/18
13. Oktober 1987
27. April 1989

26

3734588



Signalaufbereitung

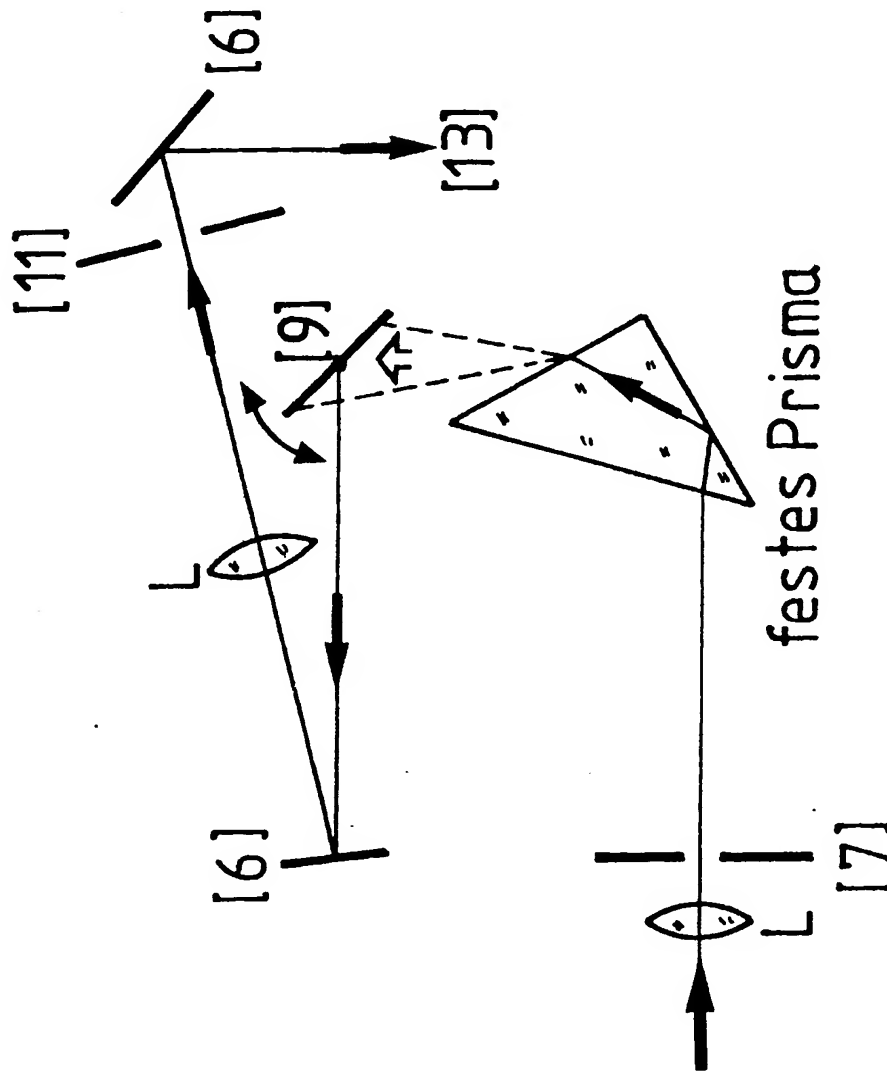
Gitterversion

Einstrahlungsspektrophotometer

27

3734588

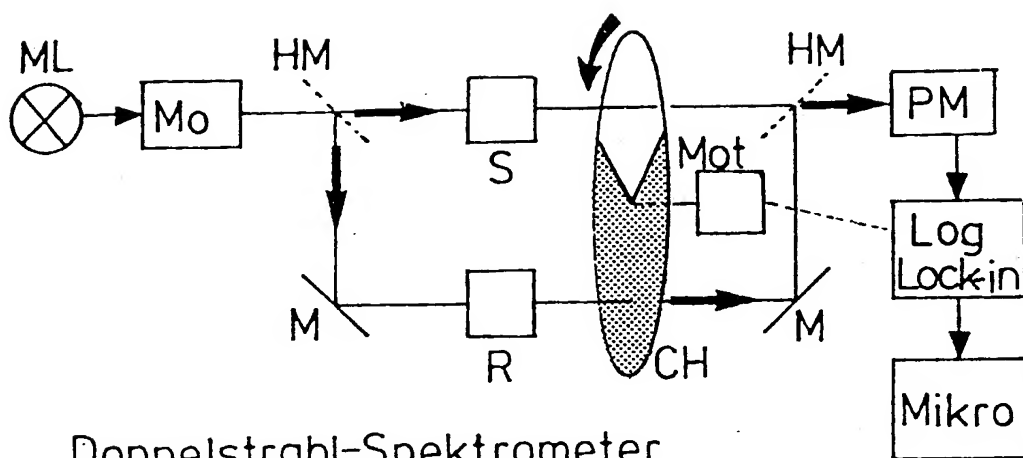
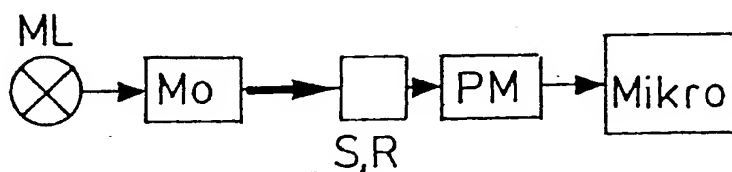
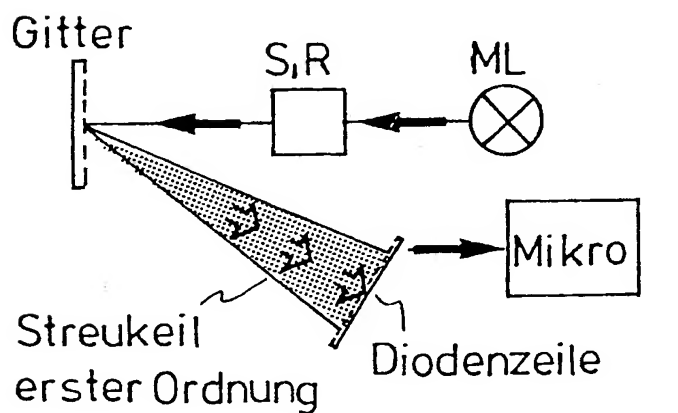
1/2



Prismenversion

28

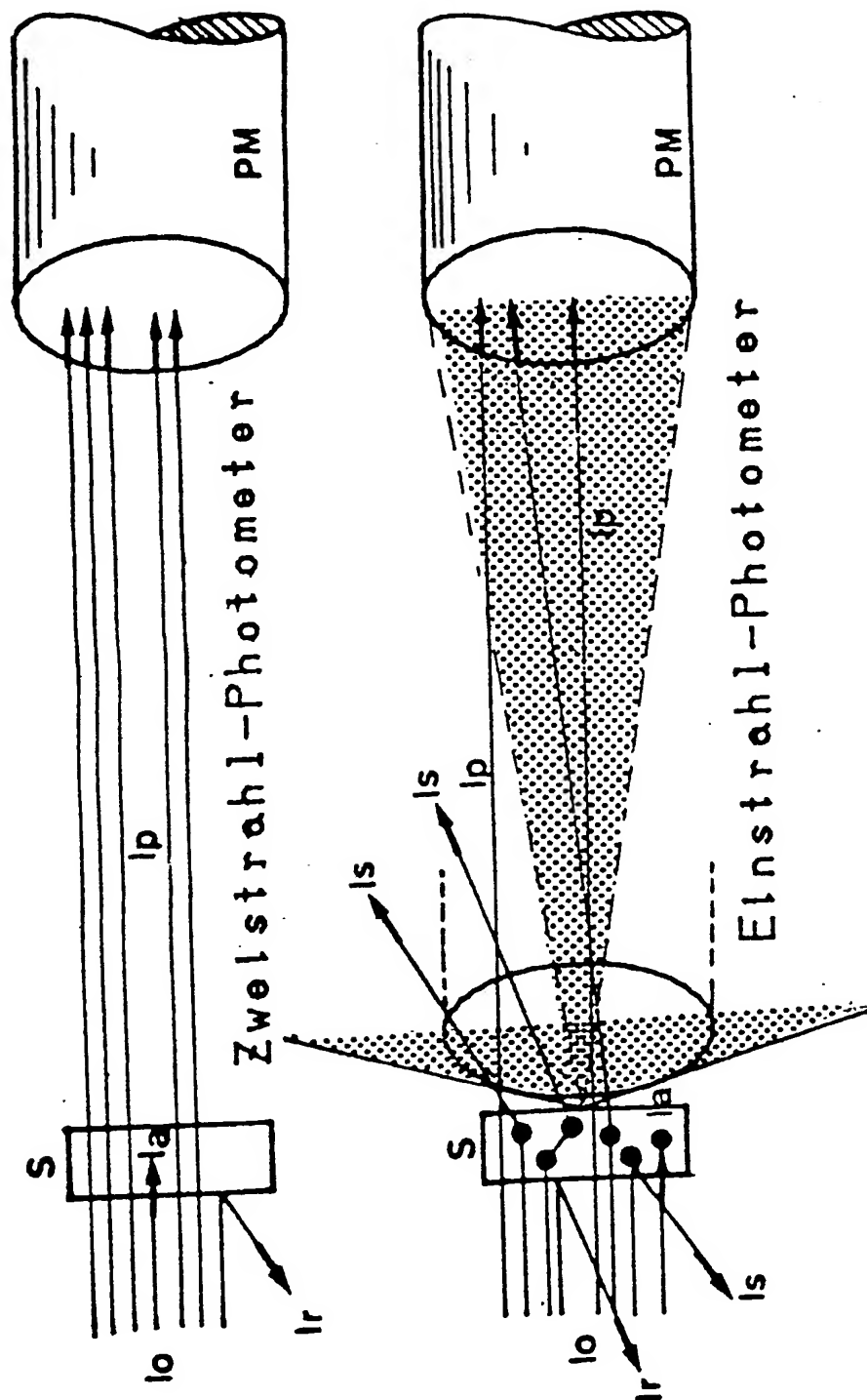
3734588

Doppelstrahl-SpektrometerEinstrahl-SpektrometerDiodenzeilen-Spektrometer

ORIGINAL INSPECTED

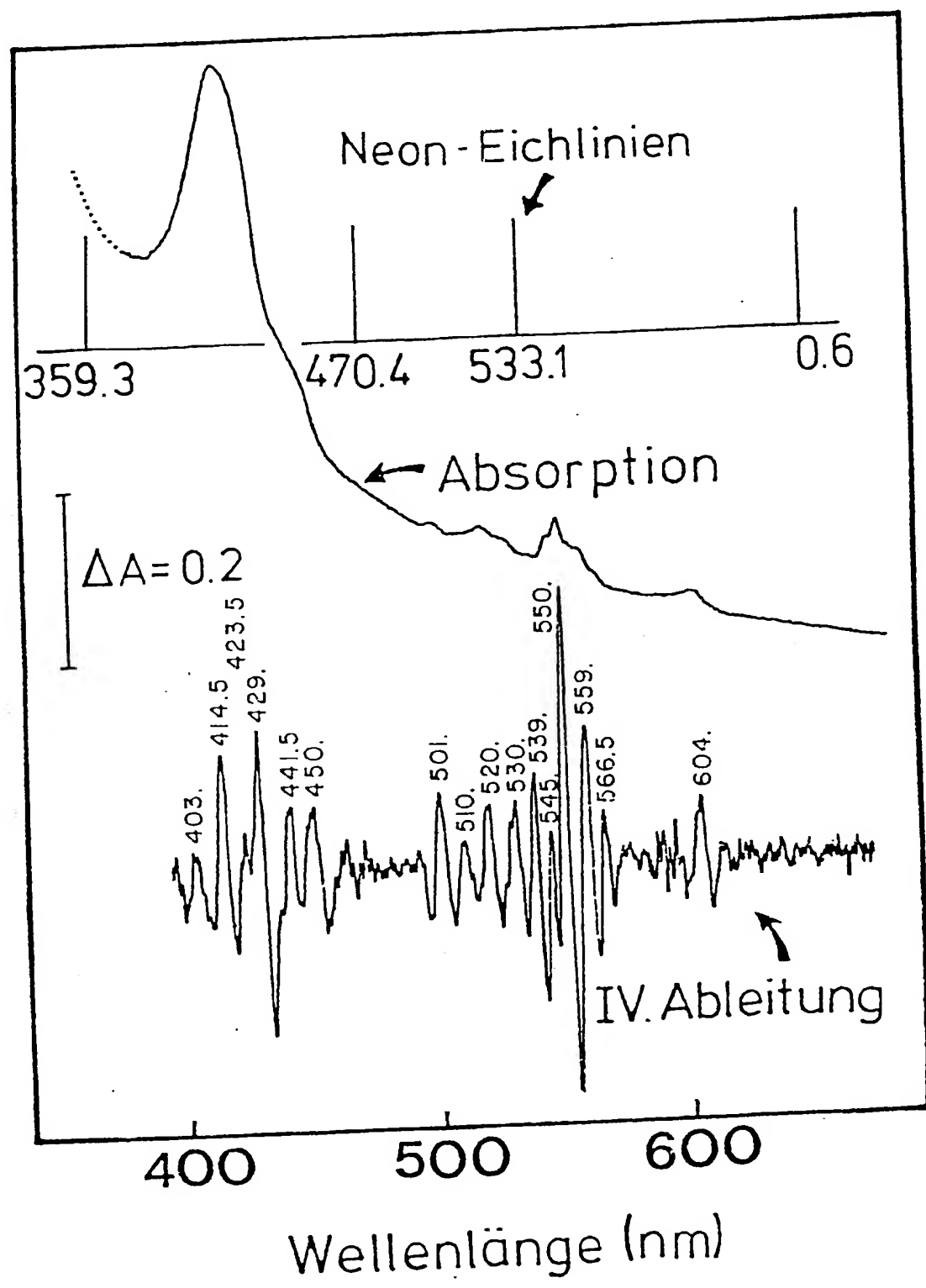
3734588

29



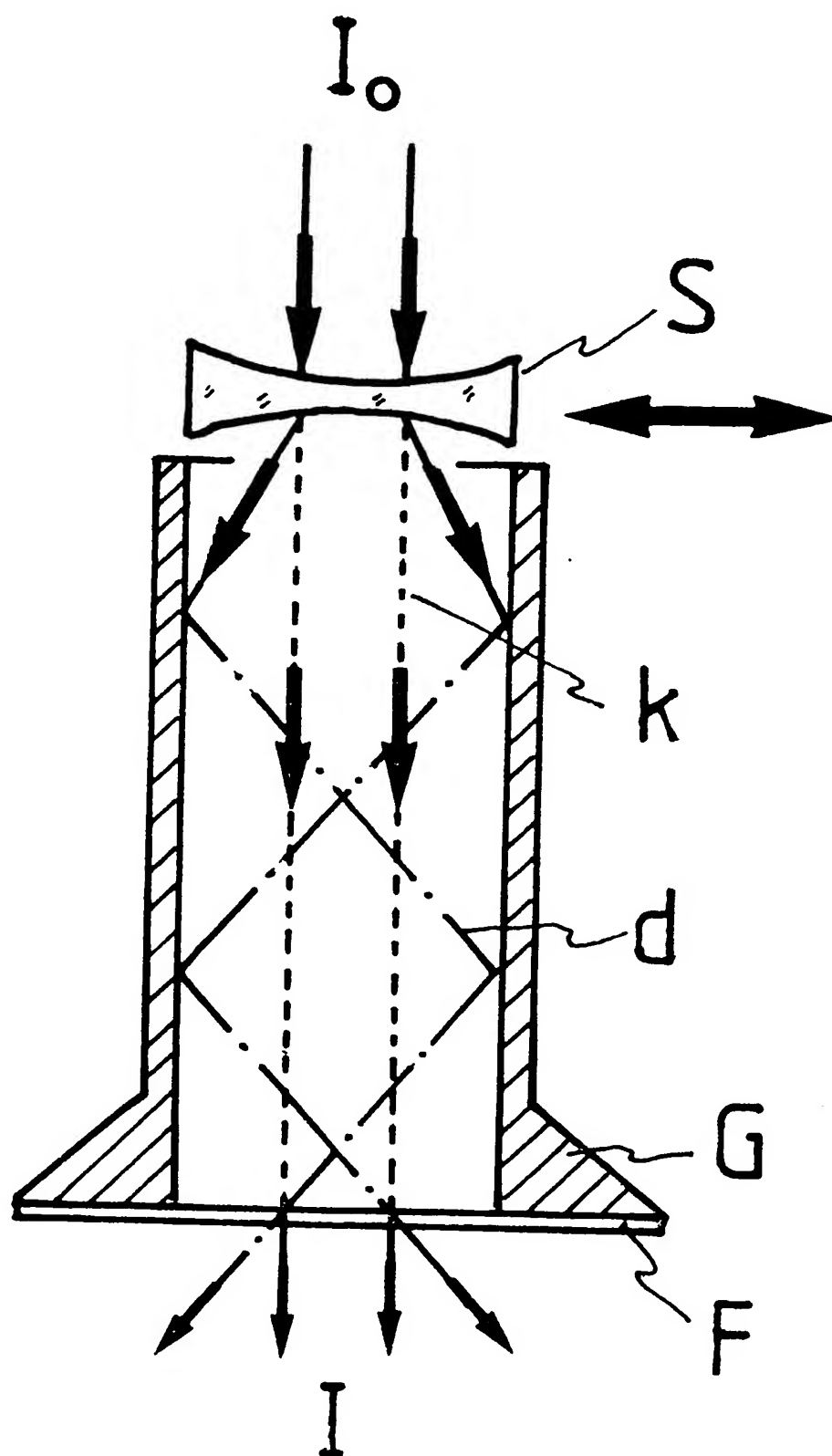
3734588

30



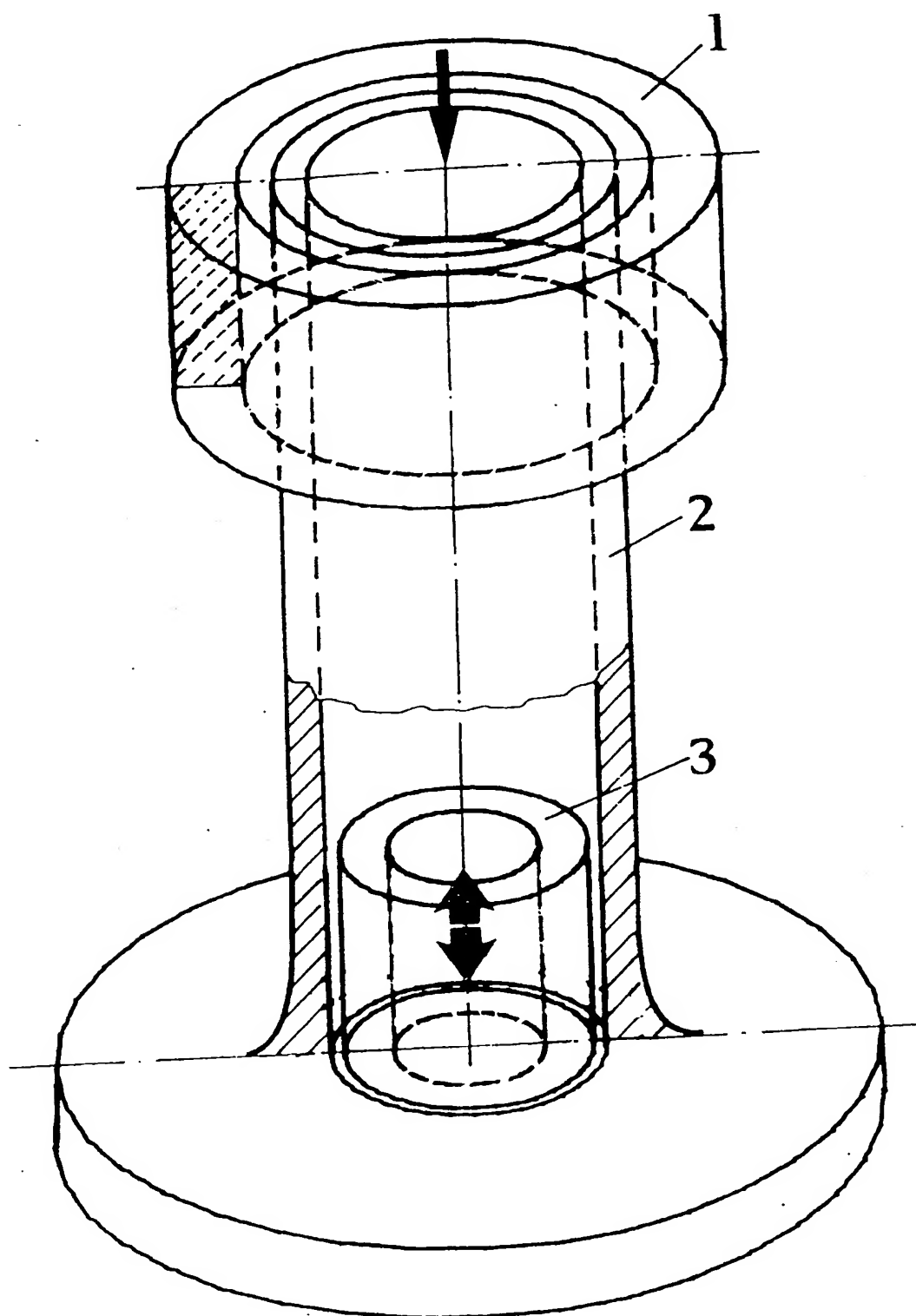
3734588

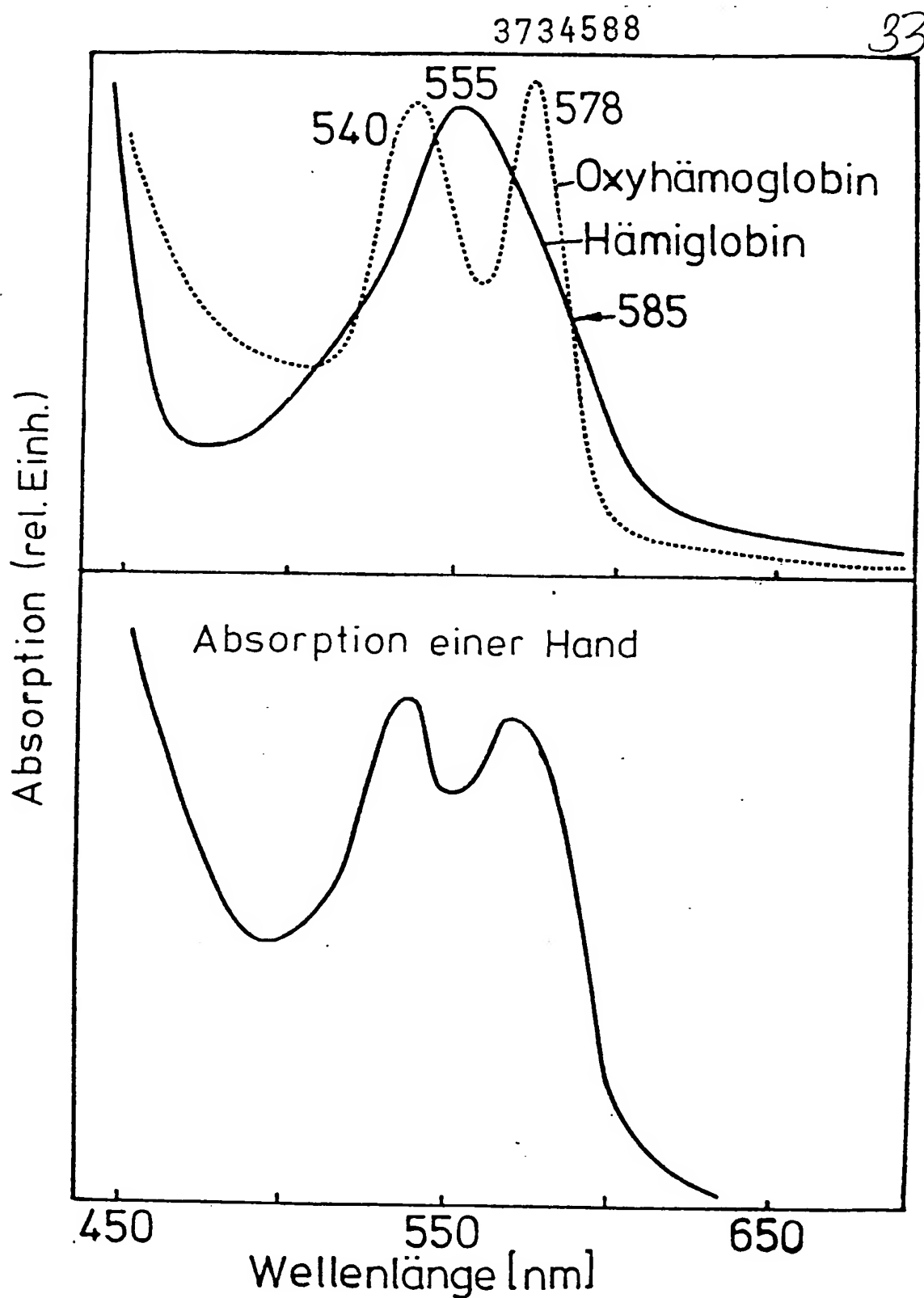
31



3734588

32

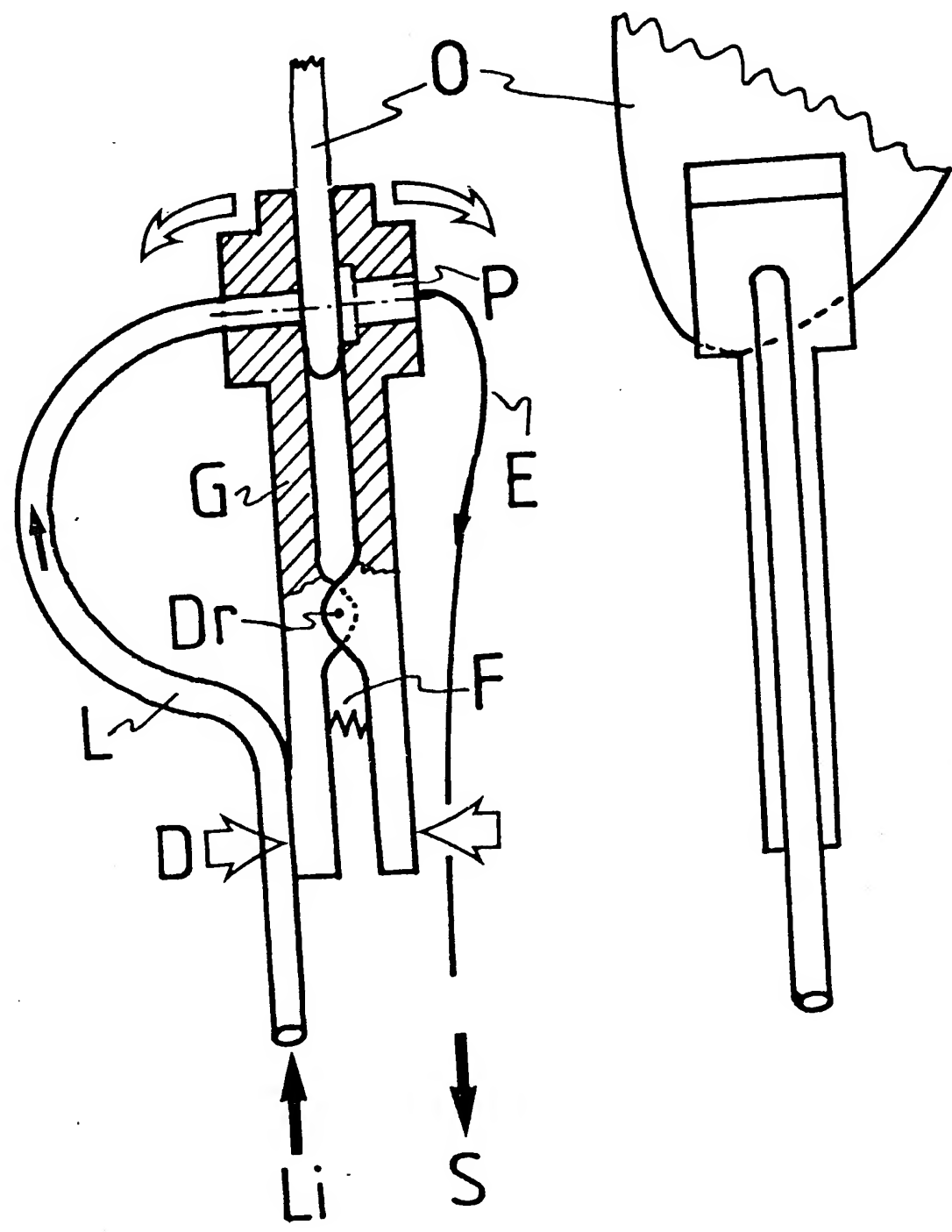




ORIGINAL INSPECTED

34

3734588

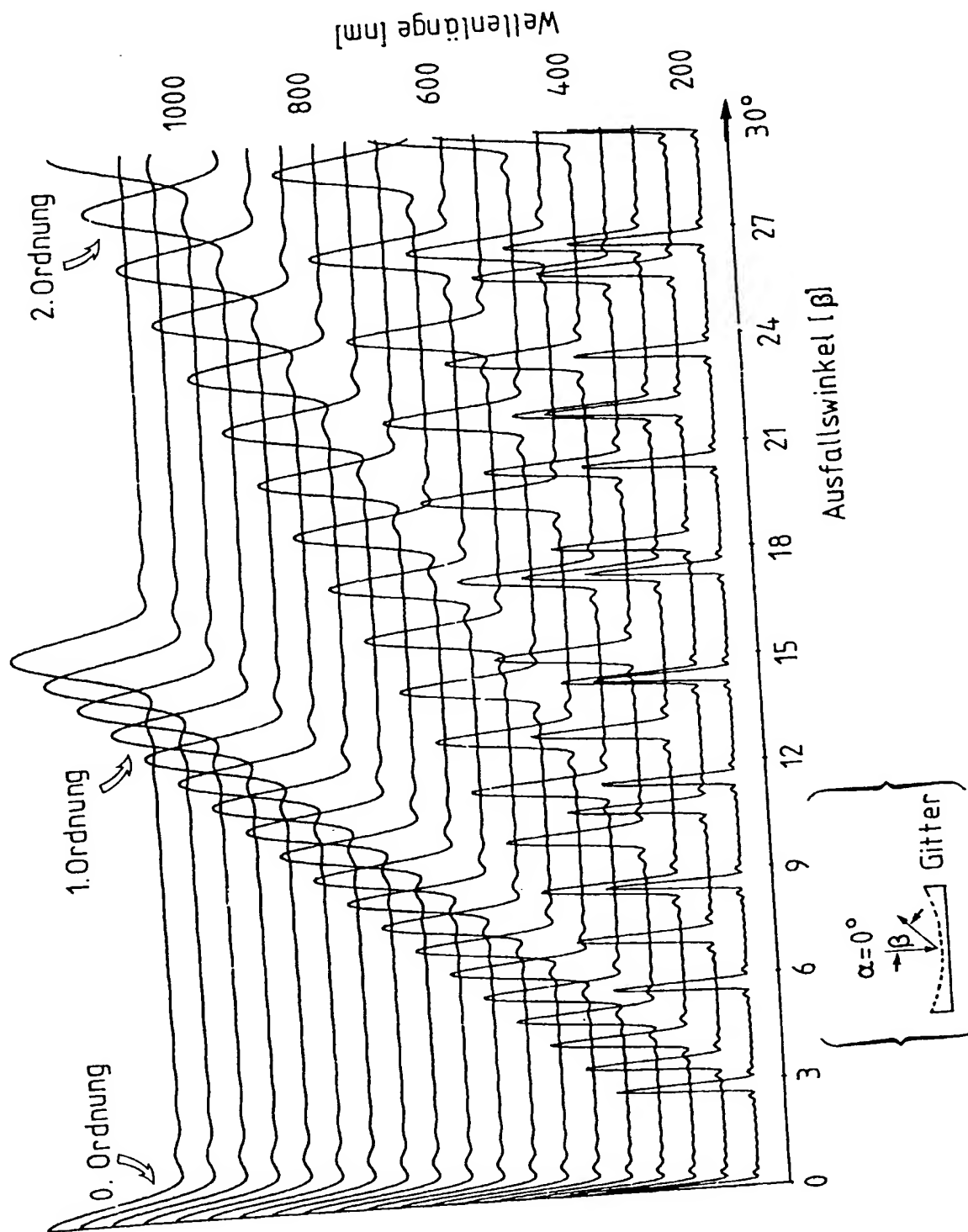


ORIGINAL INSPECTED

3734588

35*

Hill. 9



ORIGINAL INSPECTED